

刺参管足 SMART cDNA 文库构建及 EST 分析

李栋 常亚青 王玉丹 丁君

(大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室,大连 116023)

摘要: 以大连广鹿岛野生刺参的管足 mRNA 为材料,利用 SMART cDNA Construction Kit 构建了表达型 cDNA 文库。初始文库的滴度为 1.3×10^6 PFU/mL,蓝白斑估测重组率合格。扩增后获得 96 mL 文库,滴度为 1.8×10^{10} PFU/mL,从扩增文库中随机挑取 200 个噬菌斑进行 PCR 检测,电泳检测结果表明重组率大于 90%,片段大小在 0.25 - 2.0 kb 之间的插入片段占 80.4%,文库构建成功。随机选择 122 个噬菌斑转化为质粒 pTriplEx2 并测序,测序成功率 83.6%,软件处理后 100 bp 以上的 clean ESTs 有 72 条,测通的为 65 条,占成功测序样品的 63.7%。72 条序列经 SeqMan 软件拼接,获得 48 条 contig/singletons,在线 Blast 比对发现其中 26 条具有同源序列并获得注释,另外 20 条可能为新基因,其功能和结构有待进一步利用生物信息学的方法进行分析和研究。

关键词: 刺参 管足 cDNA 文库 EST 分析

Construction of SMART cDNA Library from Tube Foot of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) and EST Analysis

Li Dong Chang Yaqing Wang Yudan Ding Jun

(Ministry of Agriculture Key Laboratory of Mari Culture, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract: We constructed the full-length cDNA library from the tube foot of adult sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) captured from Guanglu Island in Dalian, China. Poly-A RNA of high quality was used as starting material, and double strand cDNA was synthesized following the Long-Distance PCR protocol provided by SMART cDNA library construction kit (Clontech). The primary cDNA library constructed had a titer of 1.3×10^6 PFU/mL, and the 96 mL amplified library has a titer of 1.8×10^{10} PFU/mL. Random PCR screening of 200 plaques indicated that 80.4% of the inserts scattered between 0.25 - 2 kb and the recombination efficiency was about 90%. 122 plaques were randomly selected and converted to plasmid pTriplEx2 for sequencing, and after further procession 72 clean ESTs were obtained from which we got 48 contig/singletons after assembling with software SeqMan. 26 of these contig/singletons were annotated through online BLAST, while others remained for further study of its function.

Key words: *Apostichopus japonicus* Tube foot cDNA library EST analysis

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 具有较高的营养和药用价值,是我国北方重要的养殖海珍品;而且刺参进化地位独特,具有夏眠、排脏再生等独特的生命现象,国内外学者对刺参的生态、生理及生物学等进行了大量研究^[1]。管足是刺参主要的运动器官,刺参的神经系统和水管系统都经分支而向管足延伸,同时管足可以进行气体交换,具有辅助呼吸的功能^[1,2]。在生产上,刺参管足的吸附能力被作为反

应体健康状况,评定刺参等级优劣的重要指标。

构建 cDNA 文库是研究生物体功能基因组的重要手段,尤其全长 cDNA 文库的构建可以高效、大规模获得基因序列,并且序列大多数包括 3' 和 5' 端的非编码区,对基因组庞大和尚未获得全基因组序列的物种而言,是进行基因组研究的一条重要途径。在刺参遗传背景并不完全清楚情况下,科研人员积极开展了刺参 cDNA 文库的构建工作,推动了

收稿日期:2011-02-18

基金项目:国家“863”计划项目(2006AA10A411, 2010AA10A401)

作者简介:李栋,男,硕士研究生,研究方向:刺参遗传育种;E-mail:ld2343@163.com

通讯作者:常亚青,男,教授,博士生导师,研究方向:海洋动物遗传育种与养殖;E-mail:yqchang@dlou.edu.cn

刺参功能组学的研究进展。陈璐等^[3]利用 λ TriplEx2载体构建了刺参肌肉组织的cDNA文库。周遵春等^[4]构建了刺参体壁、肠和呼吸树全长cDNA文库并进行了大规模测序和数据初步分析。郑法新^[5]、Rojas-Cartagena和Ortiz-Pineda等^[6,7]构建了海参肠组织及再生肠组织的cDNA文库并对可能与再生相关的基因进行了筛选,而Ramírez-Gómez等^[8]则利用海参*Holothuria glaberrima* cDNA文库对可能与免疫相关的基因进行了发掘。

本研究以野外采捕健康刺参的管足为试验材料,构建表达型SMART cDNA文库,随机挑选重组克隆进行测序并对获得的EST序列进行拼接、比对和分析,以期对这一重要器官的基因表达进行探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源 刺参10头,取自大连广鹿岛海域,平均体重430g,暂养于大连海洋大学农业部海洋水产增殖学重点开放实验室。暂养条件:水温18-20℃,盐度30‰,隔日换水100%,24h充气,投喂刺参配合饲料。

1.1.2 主要试剂 RNA提取RNAiso Plus及DNA/RNA marker为TaKaRa公司产品,mRNA分离试剂盒Oligotex mRNA Mini Kits为Qiagen公司产品,文库构建及PCR检测试剂盒SMARTTM cDNA Library Construct Kit和AdvantageTM cDNA PCR Kit为Clontech公司产品,文库噬菌体包装蛋白MaxPlaxTM Lambda Packaging Extracts为Epicentre公司产品,质粒提取使用天根质粒小提试剂盒。其他常用药品均为上海生工分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取、mRNA分离及浓缩 从活体海参上剪取海参管足,用滤纸吸干海水,液氮速冻并研成粉状,加入适量RNAiso Plus提取总RNA。琼脂糖电泳检测,紫外分光光度计扫描,计算浓度。用Oligotex mRNA Mini Kit分离mRNA,紫外分光光度计扫描,计算浓度。用NH₄Ac-乙醇沉淀法浓缩。

1.2.2 cDNA文库的构建及扩增 以SMART IV Oligonucleotide及CDS III/3'PCR Primer为引物合成5'端完整的单链cDNA。以5'PCR Primer和CDS

III/3'PCR Primer为引物,确定最佳循环数后在Advantage 2 PCR Kit作用下PCR反应合成cDNA第2链,并取5 μ L凝胶电泳检测。双链cDNA经蛋白K消化、Sfi I酶切及片段分级分离和纯化后,连接到 λ TriplEx2载体上。连接产物由MaxPlax Lambda Packaging Extract进行噬菌体包装,形成初始文库。

检测初始文库滴度,蓝白斑估测重组率。质量合格后,将文库与感受态*E. coli* XL-Blue和1 \times λ 稀释缓冲液混匀,37℃培养15min后加入LB/MgSO₄表层琼脂,倒在37℃预热的LB/MgSO₄平板上,使均匀分布。37℃培养,到噬菌斑开始互相接触为止,向每个平板加入12mL 1 \times λ 稀释缓冲液,4℃过夜,收集合并缓冲液形成扩增文库。检测文库滴度,PCR检测重组率,加入7%的DMSO,混匀后放入冰箱-80℃保存。

1.2.3 cDNA文库的质量鉴定 文库滴度检测:1 μ L噬菌体10倍稀释液加到200 μ L感受态XL-Blue *E. coli*菌液中,37℃,10-15min,噬菌体吸收。加入2mL熔化的表层琼脂混匀,倾倒在37℃预热的LB/MgSO₄平板上,37℃培养6-18h,计数噬菌斑。

文库滴度(PFU/mL) = 透明噬斑数 \times 稀释倍数 $\times 10^3$ /铺平板的稀释噬菌体的体积(μ L);库容量 = 库包装体积 \times 滴度^[9]。

cDNA文库重组率测定:随机挑取分离好的噬菌斑到100 μ L 1 \times λ 稀释缓冲液中,4℃过夜。分别取5 μ L作为模板,用试剂盒说明书中提供的引物和条件进行PCR扩增。1%琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小,计算重组率。

1.2.4 噬菌体的质粒化及质粒提取 挑分离好的单斑到350 μ L 1 \times λ 稀释缓冲液中。涡旋,4℃过夜溶解。在无菌小管内加入200 μ L感受态*E. coli* BM25.8,150 μ L噬菌斑溶解液,31℃,静置30min。加入400 μ L LB培养基,31℃,225 r/min,60min。取10 μ L涂布LB/carbenicillin平板,31℃培养。每个平板挑取几个分离好的单菌落为模板PCR检测,用天根质粒小提试剂盒提取含有插入片段的质粒。

质粒样品-20℃暂存,送上海生工用T7测序,根据测序结果对部分质粒反向测序。

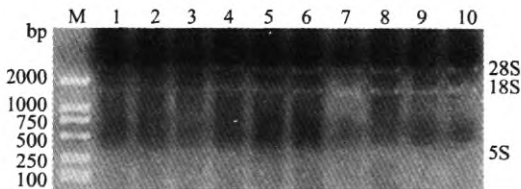
1.2.5 EST序列分析 首先根据Bioedit软件及人

工鉴别去除信号模糊和长度小于 150 bp 的低质量 EST 序列,用 VecScreen 在线载体序列比对工具寻找并去除插入片段两端的载体序列及 poly-A 尾,将获得的 clean ESTs 序列提交国际生物技术信息中心 (NCBI)。利用 SeqMan 软件进行拼接,获得重叠群 (contigs) 或单一的 EST 序列 (singletons), 利用在线核苷酸序列比对程序 Blastn、Blastx 对 Nucleotide collection (nr/nt)、Non-human, non-mouse ESTs (est others) 和 Non-redundant protein sequences (nr) 数据库进行同源搜索。参数设置为默认。根据比对结果,对 ESTs 进行功能注释。对没有显著同源性的序列进行开放阅读框和蛋白结构域的查找。

2 结果

2.1 总 RNA、mRNA 质量鉴定

总 RNA 甲醛变性琼脂糖电泳检测,条带清晰,28S 条带亮度约为 18S 的 2 倍,表明完整且无污染 (图 1)。浓缩 mRNA 紫外扫描曲线特征明显,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 2.0 以上,表明纯度很高,mRNA 计算浓度为 0.4 μg/μL (图 2)。起始材料满足 cDNA 文库构建的要求。



M. DL2000; 1-10. 刺参管足总 RNA

图 1 刺参管足总 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳

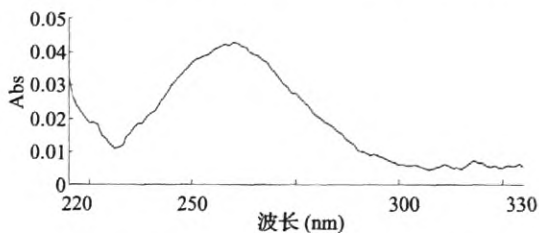
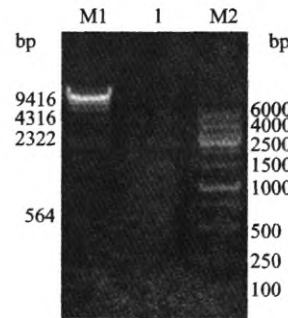


图 2 刺参管足 mRNA 紫外扫描曲线

2.2 双链 cDNA 质量鉴定

琼脂糖电泳检测表明双链 cDNA 主要分布于 0.3-6 kb (图 3),蛋白酶 K 消化,Sif I 酶切后片段分级分离,收集到 16 个离心管内。电泳检测,其中第 7-10 管分布于 500 bp 以上。合并后加入醋

酸钠、糖原、乙醇,过夜沉淀,加 7 μL 去离子水溶解。

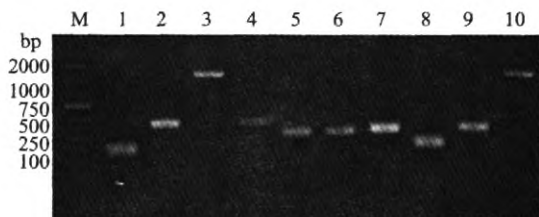


M1. λ -Hind III digest DNA Marker; M2. Wide Range DNA Marker (1000-6000 bp); 1. 刺参管足 ds-cDNA

图 3 刺参管足双链 cDNA 1% 琼脂糖凝胶电泳

2.3 cDNA 文库质量鉴定

经鉴定,初始文库滴度为 1.3×10^6 PFU/mL,库容量为 7.2×10^5 。库容量扩增后文库 96 mL,滴度为 1.8×10^{10} PFU/mL。挑取 200 个噬菌斑单斑作为模板,PCR 结果表明重组率大于 90%,片段大小在 0.25-2.0 kb 之间的插入片段占 80.4%,片段主要集中在 0.3-1.8 kb (图 4)。各方面指标达到文库构建的要求。



M. DL 2000 marker; 1-10. 插入片段 PCR 产物检测

图 4 文库插入片段 PCR 检测

2.4 随机质粒化及测序

文库侵染宿主菌 *E. coli* XL1-Blue,培养形成噬菌斑,采用随机选择的方法挑取噬菌斑并化为质粒 pTriplEx2,挑取宿主 *E. coli* BM25.8 单菌落进行 PCR 检测,将包含 0.25-2.0 kb 插入片段的 122 个菌落进行质粒提取并测序,测序成功 102 个,成功率为 83.6%。

2.5 EST 序列分析

随机挑取噬菌斑并转化为质粒 pTriplEx2,根据菌落 PCR 结果选择插入条带在 250 bp 以上的菌落

培养并提取质粒。先后将 112 个质粒样品送上海生物工程有限公司用 T7 引物测序,根据测序结果对需要反向测序的按照 SMART cDNA 文库构建试剂盒体构引物序列进行反向测序,测序成功 102 条,测序成功率 83.6%。软件处理后 100 bp 以上的 clean ESTs 有 72 条,提交到国际生物技术数据中心 (NCBI),其 GenBank 登录号:HS975108-HS975179。检测到 5' 端载体序列,即测通的有 65 条,占成功测序样品的 63.7%。72 条序列经 SeqMan 软件拼接,获得 48 条 contig/singleton,将 contig/singleton 统一看作独立的转录本 (tentative unique transcript, TUT),其表达丰度统计如表 1 所示。

利用在线 Blast 程序寻找同源序列,blastx 认为得分大于 80,相似度大于 35% 的序列相似性显著,blastn 得分大于 150,E 值小于 -30 认为高度相似^[10]。

表 1 刺参管足 EST 测序丰度统计

表达丰度	TUTs 数目/比重 (%)	EST 数目/比重 (%)
1	38/79.17	38/52.78
2	5/4.17	10/13.89
3	2/4.17	3/4.17
4	1/2.08	4/5.55
5	1/2.08	5/6.94
12	1/2.08	12/16.67
合计	48/100	72/100

结果发现高度同源序列的有 26 条,与海参已知序列同源的占 61.5%,其中 TUT7 为刺参 nad2 基因、TUT33 为刺参铁蛋白基因、TUT43 为刺参室管膜相关蛋白前体基因,部分获得注释的 TUTs 如表 2 所示。未发现高度同源序列的有 20 条,可能为新基因,其结构和功能有待进一步利用生物信息学的方法进行分析和研究。

表 2 部分刺参管足 EST 序列拼接后 Blast 比对结果

转录本	长度 (bp)	功能注释	E 值	相似度 (%)
2	1381	果糖二磷酸醛缩酶 A (<i>Homo sapiens</i>)	8e-83	87
5	754	细胞周期及凋亡调控蛋白 1 (<i>Harpegnathos saltator</i>)	3e-31	40
7	1016	NADH 脱氢酶第二亚基 (<i>Apostichopus japonicus</i>)	4e-87	88
11	511	BRAFLDRAFT124590 (<i>Branchiostoma floridae</i>)	5e-25	49
12	658	XP797802 (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)	2e-85	87
22	813	60S 核糖体亚基轻链 L13 蛋白 (<i>Danio rerio</i>)	1e-26	83
26	395	BRAFLDRAFT81970 (<i>Branchiostoma floridae</i>)	1e-25	69
33	1236	铁蛋白 (<i>Apostichopus japonicus</i>)	5e-95	99
38	373	KIAA1450 样蛋白 (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)	3e-18	49
40	291	肠再生表达基因 (<i>Holothuria glaberrima</i>)	2e-75	88
43	125	室管膜相关蛋白前体 (<i>Apostichopus japonicus</i>)	1e-54	99
46	292	ART3 蛋白 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1e-15	82

3 讨论

3.1 刺参管足 SMART cDNA 文库构建

构建表达文库的前提是获得高纯度、完整的 mRNA,而且为了尽可能避免 LD-PCR 合成双链 cDNA 时对基因表达丰度产生影响,这就要求起始 mRNA 的浓度应尽量高一些以保证 PCR 循环数较低。前提则是总 RNA 的量要大,完整性要好,而对总 RNA

的纯度要求不是特别高。本研究采用 Trizol 法提取总 RNA,方法简便快捷,有效避免了 RNA 的降解,另外,用 RNA 分离柱直接分离 RNA 避免了酚氯仿抽提和乙醇沉淀,产物纯度较高、完整性好,产量大,为 mRNA 的分离提供了保障。用 Oligotex mRNA Mini Kit 分离 mRNA,获得了高纯度的 mRNA。经过沉淀法浓缩后 mRNA 浓度达到 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,

在 LD-PCR 法合成双链 cDNA 的过程中,最大限度降低了循环数,降低了扩增反应对真实表达丰度的影响。

本研究采用了 SMART 逆转录技术,在反转录进行到 mRNA 的 5'末端时,Super Script 反转录酶促成“模板跳跃”使特定的 SMART IV 寡核苷酸接头添加到 mRNA 的 5'端,逆转录酶跳移并继续转录至该接头的末端,由于这种跳跃常发生在真核生物的帽子结构,因此只有 5'端完整的 mRNA 才能在文库中得到富集^[11]。cDNA 文库的构建是研究生物体功能基因组的重要技术手段,利用 cDNA 文库获得的 EST 数据库在新型分子标记的开发^[12-14],新基因功能研究和系统进化^[15,16]中发挥了重要作用。通过构建不同处理的差减文库,可以有针对性地对在特定组织特定生理条件下的基因表达进行挖掘^[17]。相对于普通文库,全长 cDNA 文库不仅能提供完整的 mRNA 信息,而且可以通过基因序列比对得到 mRNA 剪接信息,可以对蛋白质序列进行预测以及进行体外表达的研究。

文库的代表性和重组片段的完整性是影响 cDNA 文库质量的关键因素,理论上每个 cDNA 文库至少应包含 3.3×10^5 个独立克隆,以保证有 99% 的概率从库中筛选出低丰度 RNA 的 cDNA 克隆^[9]。本研究构建的原始原始文库的滴度为 1.3×10^6 PFU/mL,库容量为 7.2×10^5 ,扩增后文库滴度为 6.0×10^9 PFU/mL。噬菌斑 PCR 鉴定表明,重组率大于 90%,片段大小在 0.25 - 2.0 kb 之间的插入片段占 80.4%。另外,本研究构建的刺参管足文库以 λ TriplEx2 为载体,除了具有噬菌体文库库容量大,代表性强,易检测等优点,还保证了插入片段有以 3 个不同的阅读框获得表达的机会。

3.2 刺参管足 cDNA 文库测序 EST 分析

表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 是指从特定组织来源的 cDNA 文库中随机挑选克隆进行 3'或 5'端测序后得到的部分 cDNA 序列,长度一般在 300 - 500 bp 左右,广泛应用于新基因的发现、基因克隆、功能分析、基因作图等方面。

本研究测序结果处理后获得 72 条干净 EST 序列,SeqMan 软件拼接获得 48 条 contig/singletons (TUTs),获得注释的序列功能涵盖基础代谢、生长、

通信、蛋白表达、免疫及转运,而以基础代谢和蛋白表达相关基因最多。其中具有最高表达丰度 (16.7%) 的 TUT2 与人类果糖二磷酸醛缩酶 A 基因 (ALDOA) 高度同源,ALDOA 的作用是在糖酵解途径中将 1,6-果糖二磷酸分解为 3-磷酸甘油醛和二羟丙酮磷酸。另外一个表达丰度较高 (6.9%) 的 TUT7 与 NADH 脱氢酶第二亚基基因高度同源,NADH 脱氢酶是电子传递链 3 个质子泵中的第一个,是一个大的蛋白复合体,在生物氧化的电子传递中起重要作用,它能与 NADH 结合并将 NADH 上两个高势能电子传递给辅酶 Q。这两个基因都参与能量代谢,反映出在正常生理状态下刺参管足的能量代谢非常活跃。刺参铁蛋白基因 (TUT33) 表达丰度也比较高,铁蛋白的主要生理功能是储存机体中的过剩铁,避免产生铁中毒和释放铁给需铁的细胞,用于体内生物合成含铁的蛋白质或酶,同时还可以防止铁双氧过程中所产生的自由基带来的伤害。铁蛋白除了参与体内铁的调节,还在 LPS 应激免疫中发挥作用。在与刺参进化距离比较接近的海星、文昌鱼的研究中发现 LPS 刺激可以引起铁蛋白表达和翻译水平明显的升高^[18, 19]。但 Ramírez-Gómez 等^[8, 20]学者的研究发现海参铁蛋白基因的表达不受 LPS 刺激的影响,只是不能排除刺参铁蛋白基因通过转录后水平的调节参与免疫作用的可能。另外,刺参管足中铁蛋白表达丰度颇高可能与 NADH 脱氢酶 2 (nad2) 的高度表达是相关的,因为 NADH 脱氢酶的第二个辅基为含有铁原子的铁硫簇,而刺参铁蛋白的主要作用即为调节铁元素的平衡和抗氧化。TUT43 为刺参室管膜相关蛋白前体,室管膜蛋白 (Epd) 最初在硬骨鱼类脑组织中发现,可能与神经可塑性和再生相关,随后在两栖类、哺乳类及无脊椎后口动物和原口动物中陆续发现了室管膜相关蛋白 (Epdrs)^[21]。刺参 Epd 基因在肠组织及再生肠组织中获得鉴定^[5],本研究发现这一基因在管足中同样表达,其功能有待进一步研究。

本研究获得 48 条 TUTs,具有同源性的 26 条序列中 61.5% 为刺参已知序列,但多数功能并不清楚,这是因为目前对刺参基因组的研究还处于起步阶段,信息比较匮乏。虽然,目前刺参 EST 序列已经有 7 669 条,但尚没有 unigene 基因序列。这也反

映出刺参表达组学的研究还有很大发展空间,对现有 EST 数据的分析和利用尚不充分,有待进一步开发。因此本研究中只在其他物种发现同源序列或没有发现同源序列的刺参 EST 序列,都是寻找刺参基因的重要资源。本研究对没有高度同源序列的 TUTs 利用在线 ORF Finder 预测开放阅读框,并将翻译产物用 InterproScan 进行功能域的查找,发现 UTU24 具有 60S ribosomal L32e 结构特征、UTU34 具有过氧化物酶活性位点、UTU35 具有 RP436 跨膜结构域,而其它多数也都完整的 ORF 及导肽和疏水区结构特征。对于比较感兴趣的 UTU34,从序列上判断具有完整开放阅读框,其 3'端具有两个加尾信号“AATAA”且 poly-A 尾完整,5'端开放阅读框上游同一相位存在终止密码子,有可能为全长 cDNA。下一步将进行 RACE 验证,并进一步预测其编码产物和基因功能,而新基因的确定还需要 Northern 杂交及编码产物蛋白分离鉴定等试验的佐证。相信随着刺参文库构建及基因表达谱研究的深入,将有更多的基因序列被发现和解释。

参考文献

- [1] 常亚青,丁君,宋坚,等. 海参海胆生物学研究与养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 2004:3-112.
- [2] 朱峰. 仿刺参胚胎发育和主要系统的组织学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [3] 陈璐. 刺参肌肉组织 cDNA 文库的构建及初步鉴定[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [4] Yang AF, Zhou ZC, He CB, et al. Analysis of expressed sequence tags from body wall, intestine and respiratory tree of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Aquaculture*, 2009, 296:193-199.
- [5] Zheng FX, Sun XQ, Fang BH, et al. Comparative analysis of genes expressed in regenerating intestine and non-eviscerated intestine of *Apostichopus japonicus* Selenka (Aspidochirota: Stichopodidae) and cloning of ependymin gene. *Hydrobiologia*, 2006, 571:109-122.
- [6] Rojas-Cartagena C, Ortiz-Pineda P, Ramírez-Gómez F, et al. Distinct profiles of expressed sequence tags during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Physiol Genomics*, 2007, 31:203-215.
- [7] Ortiz-Pineda P, Ramírez-Gómez F, Pérez-Ortiz J, et al. Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber. *BMC Genomics*, 2009, 10:262.
- [8] Ramírez-Gómez F, Ortiz-Pineda PA, Rojas-Cartagena C, et al. Immune-related genes associated with intestinal tissue in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Immunogenetics*, 2009, 60:57.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW 著. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002:857-967.
- [10] Anderson I, Brass A. Searching DNA database for similarities to DNA sequences: when is a match significant?. *Bioinformatics*, 1998, 14(4):349-356.
- [11] Chenchik A, Diatchenko L, Chang C, et al. Great Lengths cDNA synthesis Kit for high yields of full-length cDNA. *Clontechiques*, 1994, 18(1):9-12.
- [12] Li JJ, Li Q. A set of microsatellite markers for use in the endangered sea urchin *Strongylocentrotus nudus* developed from *S. purpuratus* ESTs. *Conservation Genetics*, 2008, 9(3):743
- [13] Cervigni GD, Paniago N, Díaz M, et al. Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(1-2):1-10.
- [14] Coates BS, Sumerford DV, Hellmich RL, et al. Mining an *Ostrinia nubilalis* midgut expressed sequence tag(EST) library for candidate genes and single nucleotide polymorphisms(SNPs). *Insect Molecular Biology*, 2008, 17(6):607-620.
- [15] Chen MS, Zhao HX, Zhu YC, et al. Analysis of transcripts and proteins expressed in the salivary glands of Hessian fly (*Mayetiola destructor*) larvae. *Journal of Insect Physiology*, 2008, 54:1-16.
- [16] Salzburger W, Renn SCP, Steinke D, et al. Annotation of expressed sequence tags for the East African cichlid fish *Astatotilapia burtoni* and evolutionary analyses of cichlid ORFs. *BMC Genomics*, 2008, 9:96.
- [17] Le QY, Gutierrez-Marcos JF, Costa LM, et al. Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells: a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells. *The Plant Journal*, 2005, 44:167-178.
- [18] Beck C, Ellis TW, Habicht GS, et al. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, 26:11-26.
- [19] 李敏. 文昌鱼 Ferritin 基因表达及功能研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [20] 杨爱霞, 周遵春, 孙大鹏, 等. 仿刺参铁蛋白 ferritin 基因的序列分析及表达. *水产学报*, 2010, 34(6):890-897.
- [21] Suárez-Castillo EC, García-Arriarán JE. Molecular evolution of the ependymin protein family: a necessary update. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7:23.

(责任编辑 李楠)

作者: 李栋, 常亚青, 王玉丹, 丁君, Li Dong, Chang Yaqing, Wang Yudan, Ding Jun
作者单位: 大连海洋大学农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室, 大连, 116023
刊名: 生物技术通报 PKU
英文刊名: Biotechnology Bulletin
年, 卷(期): 2011(9)

参考文献(21条)

1. 常亚青;丁君;宋坚 [海参海胆生物学研究与养殖](#) 2004
2. 朱峰 [仿刺参胚胎发育和主要系统的组织学研究](#) 2009
3. 陈璐 [刺参肌肉组织cDNA文库的构建及初步鉴定](#) 2006
4. Yang AF;Zhou ZC;He CB [Analysis of expressed sequence tags from body wall, intestine and respiratory tree of sea cucumber \(*Aposlichopus japonicus*\)](#) [外文期刊] 2009(3/4)
5. Zheng FX;Sun XQ;Fang BH [Comparative analysis of genes expressed in regenerating intestine and non-eviscerated intestine of *Apostichopus japonicus* Selenka\(Aspidochirotida:Stichopodidae\) and cloning of ependymin gene](#) [外文期刊] 2006(1)
6. Rojas-Cartagena C;Ortíz-Pineda P;Ramírez-Gómez F [Distinct profiles of expressed sequence tags during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*](#) [外文期刊] 2007
7. Ortíz-Pineda P;Ramírez-Gómez F;Pórez-Ortiz J [Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber](#) 2009
8. Ramírez-Gómez F;Ortíz-Pineda PA;Rojas-Cartagena C [Immune-related genes associated with intestinal tissue in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*](#) [外文期刊] 2009
9. 萨姆布鲁克·J;拉塞尔DW;黄培堂 [分子克隆实验指南](#) 2002
10. Anderson I;Brass A [Searching DNA database for similarities to DNA sequences:when is a match significant](#) [外文期刊] 1998(04)
11. Chenchik A;Diatchenko L;Chang C [Great Lengths cDNA synthesis Kit for high yields of full-length cDNA](#) 1994(1)
12. Li JJ;Li Q [A set of microsatellite markers for use in the endangered sea urchin *Strongylocentrotus nudus* developed from 5. purpuratus ESTs](#) [外文期刊] 2008(03)
13. Cervigni GD;Paniego N;Diaz M [Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-iso-genic plant system of *Eragrostis curvula*](#) 2008(1-2)
14. Coates BS;Sumerford DV;Hellmich RL [Mining an *Ostrinia nubilalis* midgut expressed sequence tag\(EST\) library for candidate genes and single nucleotide polymorphisms\(SNPs\)](#) [外文期刊] 2008(06)
15. Chen MS;Zhao HX;Zhu YC [Analysis of transcripts and proteins expressed in the salivary glands of Hessian fly \(*Mayetiola destructor*\) larvae](#) [外文期刊] 2008
16. Salzburger W;Renn SCP;Steinke D [Annotation of expressed sequence tags for the East African cichlid fish *Astatotilapia burtoni* and evolutionary analyses of cichlid ORFs](#) [外文期刊] 2008
17. Le QY;Gutierrez-Marcos JF;Costa LM [Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells:a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells](#) [外文期刊] 2005(1)
18. Beck G;Ellis TW;Habicht GS [Evolution of the acute phase response:iron release by echinoderm \(*Asterias forbesi*\) coelomo-cytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule](#) [外文期刊] 2002(1)
19. 李敏 [文昌鱼Ferritin基因表达及功能研究](#) [学位论文] 2008
20. 杨爱馥;周建春;孙大鹏 [仿刺参铁蛋白ferritin基因的序列分析及表达](#) [期刊论文] -水产学报 2010(06)
21. Suárez-Castillo EC;García-Arriarás JE [Molecular evolution of the ependymin protein family:a necessary update](#) [外

文期刊] 2007

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_swjstb201109036.aspx